

(17)

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219878

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.CI.

C12N 15/31  
 C12N 1/21  
 C12N 15/52  
 // (C12N 15/31  
 C12R 1:02 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:02 )  
 (C12N 15/52  
 C12R 1:02 )

(21)Application number : 02-024395

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD

(22)Date of filing : 05.02.1990

(72)Inventor : FUKAYA MASAHIRO  
 TAKEMURA HIROSHI  
 TAYAMA KENJI  
 OKUMURA HAJIME  
 KAWAMURA KICHIYA

(30)Priority

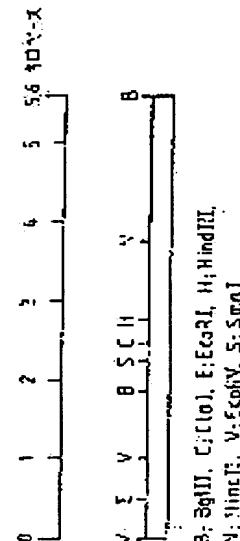
Priority number : 64 33776 Priority date : 15.02.1989 Priority country : JP

(54) ACETIC ACID-RESISTANT GENE, PLASMID CONTAINING THE SAME AND TRANSFORMED ACETOBACTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the resistance of microorganism to acetic acid and the efficiency of acetic fermentation by using an acetic acid-resistant gene originated from a microorganism of genus Acetobacter and having specific molecular size and restriction map.

CONSTITUTION: The objective acetic acid-resistant gene is originated from a microorganism of genus Acetobacter and has a molecular size of about 5.6 kilobase and a restriction map shown by the figure. Any microbial strain belonging to genus Acetobacter and exhibiting resistance to acetic acid can be used as the source for the acetic acid-resistant gene. The microorganism is e.g. Acetobacter aceti No.1023 or Acetobacter aceti IFO 3284. It is necessary for the manifestation of each gene to link a gene having promoter activity functioning in conventional host to each resistant gene in a manifestable state. The original promoter of the acetic acid-resistant gene, other gene having promoter activity and originated from acetobacter of an E.coli promoter manifestable in acetobacter can be used as the promoter for the manifestation of acetic acid-resistant gene in acetic bacteria of genus Acetobacter or Gluconobacter.



---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開  
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平3-219878

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成3年(1991)9月27日  
 C 12 N 15/31 ZNA. 7236-4B  
 1/21  
 15/52 ※  
 審査請求 未請求 請求項の数 6 (全12頁)

⑮ 発明の名称 酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び形質転換した酢酸菌

⑯ 特願 平2-24395

⑰ 出願 平2(1990)2月5日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)2月15日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-33776

㉑ 発明者 深谷 正裕 愛知県知多郡東浦町森岡字濁池1-28

㉒ 発明者 竹村 浩 愛知県半田市荒古町2-11

㉓ 発明者 多山 賢二 愛知県半田市堀崎町2-17 コープ野村半田2-201

㉔ 発明者 奥村 一 愛知県半田市岩滑東町5丁目66-14

㉕ 発明者 川村 吉也 愛知県江南市古知野町古渡132

㉖ 出願人 株式会社中埜酢店 愛知県半田市中村町2丁目6番地

㉗ 代理人 弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

### 明細書

#### 1. 発明の名称

酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び形質転換した酢酸菌

#### 2. 特許請求の範囲

1. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子。

2. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子を含むプラスミド。

3. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子を含むプラスミドによって形質転換した酢酸菌。

4. アセトバクター属の微生物に由来し、第5図、第6図及び第7図の塩基配列で示される酢酸耐性遺伝子。

5. アセトバクター属の微生物に由来し、第5

図、第6図及び第7図のアミノ酸配列で示される酢酸耐性遺伝子。

6. アセトバクター属の微生物に由来し、第5図のアミノ酸配列で示されるクエン酸合成酵素遺伝子。

#### 3. 発明の詳細な説明

##### 【産業上の利用分野】

本発明は、微生物の酢酸耐性に関する遺伝子に関するものである。

本発明の酢酸耐性に関する遺伝子を組入れたプラスミドを用いて形質転換することにより、微生物の酢酸耐性を向上させ、たとえば食酢製造における酢酸発酵を効率化することができるるので、酢酸発酵界に益するところ大なるものがある。

##### 【従来技術および問題点】

微生物の酢酸耐性を高める方法としては、自然界からのスクリーニングや種々の変異方法を使用して変異株を取得する方法などが、一般的におこなわれてきた。しかし、これらの方法で酢酸耐性を向上させた例としては、特開昭60-180581記載

## 特開平3-219878(2)

のアセトバクター・アルトアセチゲネスと命名された新種の菌やエンザイム・マイクロブ・テクノル第8巻、第117頁(1987年)記載のクロストリジウム・サーモアセチカムの変異株の例などが知られているだけである。

これは、酢酸耐性の機構が解明されておらず、目的株の選択が酢酸濃度の高い培地で生育していく菌を選択する方法しかなかったからである。

このため、目的株の取得は偶然性に期待するしかなく、多大な労力が必要であり、より効率的でしかも効果的な育種方法の出現が待たれていた。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、上記事情にかんがみ、計画的に酢酸耐性を向上させるためには、酢酸耐性を担う遺伝子を用いて組み換えDNA技術により、育種することが最も有効であると考え、観察検討をおこない、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約5.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される酢酸耐性遺伝子

又はこれを含むプラスミド又は該プラスミドによって形質転換した酢酸菌に関するものである。

本発明における酢酸耐性遺伝子源は、アセトバクター属の微生物で酢酸耐性を示す菌株であれば、特に限定はない。たとえば、アセトバクター・アセチNo1023(PERM BP-2287)やアセトバクター・アセチIFO 3284などが挙げられる。

遺伝子分離は、種々の方法で分離可能であるが、たとえばアセトバクター属の酢酸耐性が低下した変異株を用い、導入した遺伝子により、低下した酢酸耐性が、向上することを指標としておこなう方法が用いられる。酢酸耐性の低下した変異株の取得は、たとえばアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第46巻、第381頁、1982年に記載の自然変異を利用する方法やN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを変異源として用いる方法などでおこなうことができる。

酢酸耐性の低下した変異株を宿主として、酢酸耐性の低下していない親株あるいは高濃度酢酸耐性株から抽出精製した全DNAを適当な制限酵素

で切断し、適当なベクターと連結した後、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第2091頁(1985年)記載の方法で形質転換するか、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第165巻、第336頁(1986年)記載のpRK 2013などの伝達性プラスミドを用いて接合伝達法により酢酸耐性の低下した変異株を形質転換する。形質転換株のうち、宿主より酢酸耐性が向上したものを選択することにより、該遺伝子をもつ株を得ることができる。

全DNAの調製は、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第1011頁(1985年)記載の方法など通常の方法にしたがえばよい。また使用するベクターとしては、アセトバクター属で安定に保持されるものであれば特に限定はない。たとえば、特開昭60-9488に開示されているpTA 5011、pTA 5012や広宿主域ベクターpRK 2013、RP 4などが使用できる。

形質転換する酢酸菌は、アセトバクター属又はグルコノバクター属に属する微生物であればよく、

特に限定はない。

また、酢酸菌の形質転換方法としては、たとえば、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁、第2407頁(1985年)記載の方法などが使用できる。

得られた遺伝子の塩基配列の決定は、常法に従えばよく、たとえばM13ファージを用いたジオキシ法で決定すればよい。実施例に示したごとく、酢酸耐性遺伝子は、塩基配列の結果から3種類の遺伝子から構成されている。各遺伝子の塩基配列および塩基配列にもとづいて決定されたアミノ酸配列を第5図、第6図及び第7図に示した。これら3つの遺伝子単独では、酢酸耐性を付与することができず、3つの遺伝子が同時に発現し、機能することが必要である。

各遺伝子の発現には、通常宿主内で機能するプロモーター活性をもつ遺伝子と各耐性遺伝子とを発現可能な形で連結する必要がある。アセトバクター属やグルコノバクター属の酢酸菌で酢酸耐性遺伝子を発現させるために用いるプロモーターと

## 特開平3-219878(3)

しては、酢酸耐性遺伝子本来のプロモーターも使用できるし、酢酸菌由来の他のプロモーター活性をもつ遺伝子や酢酸菌で発現可能な大腸菌のプロモーターも使用できる。

大腸菌プロモーターとしては、大腸菌プラスミドpBR 322 のアンビシリン耐性遺伝子や大腸菌プラスミドpACYC 177 のカナマイシン耐性遺伝子、大腸菌プラスミドpACYC 184 のクロラムフェニコール耐性遺伝子、大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターなどが使用できる。

プロモーター活性をもつ遺伝子は、各耐性遺伝子が宿主に影響を及ぼさないように、適当量に発現量を制御するため、おののの遺伝子で使用するプロモーター活性をもつ遺伝子をかえてもよい。過剰量に酢酸耐性遺伝子が発現し、宿主の生育等に影響を及ぼす場合には、上記のような適当なプロモーターを選択したり、ベクターを選択し、コピー数を変化させ、発現量を制御する必要がある。後者の場合には、各遺伝子をそれぞれ別のベクターに組みこみ、ベクターのコピー数の違いを

利用して、発現量を制御することもできる。また、酢酸菌内に酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片を保持させるためのベクターとしては、たとえば、特開昭60-9488に開示されているpTA 5001(A)、pTA 5001(B)や酢酸菌に導入可能な広宿主ベクターRP 4::Mu、RP 4、pRK 2013、RSF 1010などが利用できる。

なお、もともと酢酸耐性遺伝子の一部を有している宿主に酢酸耐性を付与する場合には、保有していない遺伝子のみを宿主に形質転換すればよい。また、酢酸耐性遺伝子を3つとも有している宿主の場合でも、特定の遺伝子の発現量が低く、酢酸耐性が低い場合には、必要な遺伝子を導入し、発現量を高める必要がある。

## 〔実施例〕

アセトバクター・アセチル1023(FERM BP-2287)から、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第46巻、第381頁(1982年)記載の自然変異の方法により、酢酸耐性の低下した変異株10-80を得た。親株のNo1023の酢酸耐性

が3%以上であるのに対し、10-80の耐性は1%以下であった。親株であるアセトバクター・アセチルNo1023の全DNAをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第1011頁(1985年)の方法で調製した。全DNAを制限酵素Eco RIで切断後、特開昭60-9488に開示されたベクターpTA 5011をEco RIで切断し、T4 DNAリガーゼを用いて両者を連結した。連結反応物をアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第40巻、第2091頁(1985年)の方法にしたがって形質転換した。形質転換株は、ベクター上のアンビシリン耐性遺伝子を指標とし、YPD寒天培地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.2%、寒天2%、pH6.5)にアンビシリン(50μg/ml)を加えた培地で選択した。得られた約5,000株のアンビシリン耐性の形質転換株について、YPD寒天培地に種々の濃度の酢酸を加え、レブリカ法で、酢酸耐性を調べた。宿主の10-80の酢酸耐性が1%であるのに対し、得られた形質転換株の1株のみが3%の酢酸を含む培地で

生育した。この株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法で調べたところ、ベクター以外に約7.5キロベースの遺伝子断片を含んでいた。また、上記方法とは、用いる制限酵素がBgl IIである以外は同じ方法で10-80に酢酸耐性を付与するプラスミドを単離した。約5,000株から4株のプラスミドを単離したが、いずれも、ベクター以外に約6.5キロベースの遺伝子をもっており、常法により制限酵素地図を作成したところ、4株とも同一の遺伝子断片であることが分かった。Eco RIを用いて単離した遺伝子の制限酵素地図を第2図に、またBgl IIを用いて単離した遺伝子の制限酵素地図を第3図に示す。第2図、第3図から明らかのように、Eco RIで単離した遺伝子Bgl IIで単離した遺伝子は、共通部分を有していた。

## (耐酸性に関与する遺伝子領域の決定)

上記方法で単離した遺伝子のどの領域に酢酸耐性に関与する遺伝子が存在しているかを調べるた

## 特開平3-219878(4)

めに以下の大腸菌ベクター由来のカナマイシン耐性遺伝子を用いた挿入失活実験をおこなった。

第2図に示す Eco RI断片を大腸菌ベクターpUC 18のEco RI部位に常法によりクローニング化した。

このキメラプラスミドをCla Iで切断した。pUC 18は、Cla Iで切断されないため、Eco RI断片上に1ヶ所あるCla I部位で唯一1ヶ所切断される。

一方、大腸菌ベクターpACYC 177(ジャーナル・オブ・バイオロジー、第134巻、第1141頁(1978年) ATCC 37031として寄託されている。)をベクター上のカナマイシン耐性遺伝子を切断しないように制限酵素Hae IIで切断した。Cla Iで切断したキメラプラスミドおよびHae IIで切断したpACYC 177を常法にしたがいT4 DNAポリメラーゼ処理し、切断末端を平滑化した。平滑化した後、常法にしたがいT4 DNAリガーゼを用いて両者を連結した。連結物を常法にしたがい、大腸菌宿主 E.coli JM 109に形質転換した。形質転換株は、LB培地("A Manual for Genetic Engineering"第201頁、Cold Spring Harbor Laboratory, 1980年)にアンビシ

リン $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカナマイシン $30\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む寒天培地(寒天濃度1.5%)で選択した。得られた形質転換株のプラスミドをBirnboimとDolyの方法(Nucleic Acids Res., 第7巻、第1513頁、1979年)にしたがい調べ、分子サイズ及び制限酵素解析からpUC 18、Eco RI断片およびpACYC 177のカナマイシン耐性遺伝子を含む遺伝子断片の3者のキメラプラスミドを得た。ここで得られたキメラプラスミドは、pUC 18のEco RI部位に第2図で示される酢酸耐性遺伝子部分が組み込まれ、さらに組み込まれた酢酸耐性遺伝子部分のCla I部位にpACYC 177由来のカナマイシン耐性遺伝子が組み込まれた構造となっている。この組み換えプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁(1985年)記載の方法で、アセトバクター・アセチ $\text{Na} 1023$ に形質転換した。形質転換株は、上記 YPG寒天培地にカナマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた培地で選択した。形質転換用いたベクターは、大腸菌ベクターであり、大腸菌で複製するのに必要な機能は有

しているが、アセトバクター属では複製できない。このため、得られたカナマイシン耐性の形質転換株は、アセトバクター属の宿主の染色体ないしはプラスミドDNA上の相同部位と組み換えをおこし、宿主染色体またはプラスミドにカナマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。この場合、カナマイシン耐性遺伝子の組み込まれている部位が、酢酸耐性に関与しているならば、カナマイシン耐性遺伝子の挿入により、酢酸耐性遺伝子が不活性化される。このため、得られるカナマイシン耐性の形質転換株は、カナマイシン耐性の獲得と同様に酢酸耐性が低下する。第2図に示される遺伝子のCla I部位にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを用いて得られたカナマイシン耐性の形質転換株の酢酸耐性を上記した YPG寒天培地に種々の濃度の酢酸を加えて調べたところ、 $\text{Na} 1023$ 株の耐性が3%以上であったのに対し、形質転換株では1%以下に顕著に低下していた。このことから、Cla I部位が、酢酸耐性に関与する遺伝子内にあることが分かった。同様の手法にて、

第2図、第3図の各遺伝子上の制限酵素切断部位にカナマイシン耐性遺伝子を組みこんだ組み換えプラスミドを作成し、 $\text{Na} 1023$ に上記と同様にして形質転換した。(第4図にカナマイシン耐性遺伝子の挿入位置を示した。)得られたカナマイシン耐性の形質転換株の酢酸耐性を調べたところ、第1表に示すごとくなつた。

第1表

カナマイシン耐性遺伝子の挿入位置	1	2	3	4	5	6	7
得られたカナマイシン耐性	>3%	>3%	<1%	<1%	<1%	>3%	>3%
形質転換株の酢酸耐性							

これらの結果から、第1図に制限酵素地図を示す遺伝子部位が、酢酸耐性に関与する遺伝子領域であると決定した。第1図に示す遺伝子は、第4図のPst Iで切断される約7.6キロベースの遺伝子断片に含まれる形でpUC 18をベクターとして E.coli JM 109に形質転換され、E.coli AR-1の株名で、FERM P-10512として微生物研に寄託されてい

特開平3-219878(5)

る。

(酢酸菌耐性遺伝子を含む遺伝子断片の酢酸菌宿主への形質転換)

上記実施例で単離した第4図に制限酵素地図を示す遺伝子断片を *Pst* I で切断して得られる約7.6キロベースの遺伝子断片を大腸菌ベクター *pUC* 18 に組込んだ組み換えプラスミドを *E.coli* AR-1から常法により単離した。

次に、アセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナム *IFO* 3288 の有するプラスミドのうち、分子サイズが約 2.1 キロベースのプラスミドを常法により単離し、制限酵素 *Acc* I で切断した後、*T4* DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。一方、*E.coli* AR-1 から単離した *pUC* 18 の *Pst* I 部位に第4図に示される遺伝子断片を *Pst* I で切断して得られる約 7.6 キロベースの遺伝子断片を組みこんだ組み換えプラスミドを制限酵素 *Sal* I で切断し、同じく *T4* DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。

両者を *T4* DNAリガーゼにより連結し、組み換

え体を得た後、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第2485頁(1985年)に開示された方法により、アセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナム *IFO* 3288 に形質転換した。形質転換株はアンビシリン 300 μg/ml を含む YPG 寒天培地(グルコース 3%、酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.2%、寒天 2%、pH6.5)で選択した。選択培地に生育したアンビシリン耐性株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法に準じて調べた。形質転換株は元株と比較し、導入したプラスミドと同一サイズの約 12.4 キロベースのプラスミドを余分に保有しており、また、制限酵素解析により、*pUC* 18 および第4図に示される遺伝子断片を *Pst* I で切断して得られる約 7.6 キロベースの遺伝子断片およびアセトバクター・アセチ・ザブスピーシズ・キシリナム *IFO* 3288 の保有する約 2.1 キロベースの大きさのプラスミドの 3 者のキメラプラスミドであることを確認した。

上記で得られた形質転換株の酢酸耐性を元株と比較した。YPG 液体培地(上記の YPG 寒天培地から寒天を除いた組成の培地)に種々の濃度の酢酸を加えて、30℃で 4 日間振とう培養し、生育の有無について調べた。

元株では酢酸濃度 1.5% (v/v) までしか生育が見られなかったが、形質転換株では、酢酸濃度 2.5% (v/v) の培地でも生育が見られ、酢酸耐性遺伝子を含むプラスミドで形質転換することにより、酢酸菌の酢酸耐性を向上させることができた。

(酢酸耐性遺伝子の塩基配列の決定)

実施例で得た大腸菌形質転換株 *E.coli* AR-1 の保有するプラスミドを常法によって精製し、得られた精製 DNA を *Pst* I で切断して得られる約 7.6 キロベースの遺伝子断片について M13 ファージを用いたジテオキシ法(Methods in Enzymology、第 10 卷、第 20 頁、Academic Press, New York, 1983 年)によってその塩基配列を決定した。

決定した塩基配列をもとに翻訳可能領域を検索した。カナマイシン耐性遺伝子を用いた挿入失活

実験により、カナマイシン耐性遺伝子の挿入により酢酸耐性の低下した制限酵素サイト(第4図の 3、4、5)が領域内にあるような翻訳可能領域を検索したところ、第5図、第6図、第7図に示すような ATG 翻訳開始コドンから翻訳されるそれぞれ 1308 塩基、462 塩基、1224 塩基からなるアミノ酸残基 436、154、408(分子量 48120、17510、44490)をコードする領域が見出された。(第5図、第6図、第7図の塩基配列から決定されたアミノ酸配列を第5図、第6図、第7図の塩基配列の下段に示した。) 第5図、第6図、第7図の塩基配列で示されるポリペプチドが酢酸耐性の発現に関与していることは、以下のようにして確認した。第5図に塩基配列を示した遺伝子(以下 *earA* と命名)内にある *Hinc* II サイト(塩基数 655)で切断し、アミノ末端側とカルボキシ末端側を含む断片をそれぞれ調製し、翻訳フレームが合うように大腸菌発現ベクター *pUC* 18 または *pUC* 19 の β - ガラクトシダーゼ遺伝子のアミノ末端部分にあるポリリンカ部分の制限酵素サイトに *T4* DNAリカーゼを用

## 特開平3-219878(6)

い連結し、大腸菌宿主 E.coli JM 109に常法により形質転換した。得られた組換えプラスミドを保有する形質転換株をアンビシリン  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\beta$ -イソプロピルガラクトチオグルコサイド(IPTG) 1 mMを含むLB液体培地で37°C、18時間培養し、得られた菌体を0.01Mリン酸バッファー(pH7.0)で洗浄後、超音波破碎をおこない、得られた菌体破碎液を常法によりドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、クマシーブリリアントブルーで蛋白染色した。IPTGにより lac プロモーターを誘導した場合、カルボキシ末端側を含む断片を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流側に連結した組換えプラスミドでは、分子量約28,000の蛋白が著量合成されたが、アミノ末端側を含む断片を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流に第5図とは逆向きに連結した組換えプラスミドでは、特異的な蛋白の合成は見られなかった。このことから、第5図の翻訳可能領域が存在することが確認された。第6図および第7図に塩基配列を示した遺伝子（それぞれ *aarB*、*aarC* と命名）

入位置1の HindIII サイトから挿入位置6の *Bgl*II サイトの間の断片）を大腸菌ベクター pUC 19にT4 DNA リガーゼを用い、連結し、常法により組換えプラスミドを得た。このプラスミドを大腸菌のクエン酸合成酵素欠損株 E.coli ME 8330（国立遺伝学研究所に保存されている。）に常法により形質転換し、形質転換株を得た。元株と形質転換株のクエン酸合成酵素活性を Methods in Enzymology. 第13巻、第3頁(1969)の方法にしたがって測定したところ、元株の比活性が0.01ユニット/mg蛋白以下であったのに対し、形質転換株では、4.5ユニット/mg蛋白であり、顕著な活性の発現がみられた。また、先の実施例で得られた。第4図でカナマイシン耐性遺伝子の挿入位置の5にカナマイシン耐性遺伝子が挿入され *aarA* 遺伝子が欠損していると推定されるカナマイシン耐性の形質転換株のクエン酸合成酵素活性を上記の方法に準じて測定したところ、親株の比活性が0.39ユニット/mg蛋白であるのに対し、形質転換株では0.01ユニット/mg蛋白以下の比活性しかなく、クエン酸合

について、*aarB*については、*aarB*の上流にある *Nde*I サイトで、*aarC*については、*aarC*内にある *Eco* RI サイト（塩基数825）で *aarA* と同様に融合蛋白として発現させられたことから(*Nde*I サイトでは分子量17,000の蛋白が、また *Eco* RI サイトでは分子量15,000の蛋白が生産された。)、各々の翻訳可能領域が存在することを確認した。各遺伝子の翻訳開始位置は、酢酸菌と同ビグラム陰性菌である大腸菌のSD配列との類似性をもとに決定した。

(*aarA* 遺伝子の機能)

第5図に塩基配列を示した *aarA* 遺伝子の機能を明らかにするため、既知遺伝子とのホモロジー検索をおこなった。アミノ酸配列をもとにして比較したところ大腸菌、シュードモナス、リケッチアのクエン酸合成酵素と50%以上のホモロジーが見出された。*aarA* 遺伝子がクエン酸合成酵素の遺伝子であるかは以下のようにして確認した。

*aarA* 遺伝子を含む約2.9キロベースの *Hind*III - *Bgl*II 断片(第4図のカナマイシン耐性遺伝子の挿

成酵素が欠失していることが確認できた。次に、上記の第4図で制限酵素地図を示した断片の内、*aarA* 遺伝子を含む *Hind*III - *Bgl*II 断片が組みこまれた pUC 19を *Eco* RI で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑化し、一方、アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・キシリナムIFO 3288の有するプラスミドのうち、分子サイズが約 2.1キロベースのプラスミドを常法により単離し、制限酵素 *Acc*I で切断した後、T4 DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化したプラスミドDNAをT4 DNAリガーゼを用い連結し、組換えプラスミドを作成した。この組換えプラスミドは、*aarA* 遺伝子を含む *Hind*III - *Bgl*II 断片と大腸菌ベクター pUC 19とアセトバクターのプラスミドとの3者のキメラプラスミドである。このキメラプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー - 第49巻、第 2485頁(1985年)に開示された方法により、アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・キシリナムIFO 3288に形質転換した。形質転換株はアンビシリン  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む YPG 寒天培

特開平3-219878(7)

地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリベブトン0.2%、寒天2%、pH6.5)で選択した。選択培地に生育したアンビシリン耐性株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁(1985年)の方法に準じて調べ制限酵素解析により、pUC 19および第4図に示される遺伝子断片を HindIII と BglII で切断して得られる約 2.9 キロベースの遺伝子断片およびアセトバクター・アセチ・サブスピーチ・キシリナム IFO 3288 の保有する約 2.1 キロベースの大きさのプラスミドの3者のキメラプラスミドを保有していることを確認した。

上記で得られたアンビシリン耐性の形質転換株のクエン酸合成酵素の活性を、上記と同様な方法で測定したところ、4.5ユニット/mg蛋白であり、barA 遺伝子を有するプラスミドの導入により、活性が回復しただけでなく、コピー数にもとづく遺伝子増幅効果により、親株の10倍以上にまで活性が上昇した。

## 〔発明の効果〕

Gln グルタミン	Glu グルタミン酸
Gly グリシン	His ヒスチジン
Ile イソロイシン	Leu ロイシン
Lys リシン	Phe フェニルアラニン
Pro プロリン	Ser セリン
Thr スレオニン	Trp トリプトファン
Tyr チロシン	Val バリン

本発明を用いれば、従来、偶然性によってしか得ることのできなかった酢酸耐性の向上した菌株を容易に取得することができるだけでなく、酢酸耐性の向上した酢酸菌を用いることにより、酢酸発酵の効率化が可能となる。

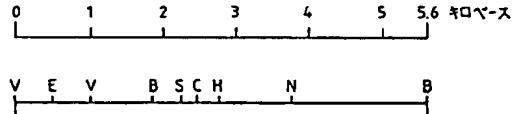
## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第2図は、Eco RIを用いて単離した酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第3図は、BglIIを用いて単離した酢酸耐性遺伝子の制限酵素地図で、第4図は、カナマイシン耐性遺伝子の挿入位置を示す。第5図、第6図及び第7図は、連続させて酢酸耐性遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。第5図は単独でクエン酸合成酵素遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列における略記号の意味は次のとおりである。

Met メチオニン	Ala アラニン
Arg アルギニン	Asn アスパラギン
Asp アスパラギン酸	Cys システイン

第1図

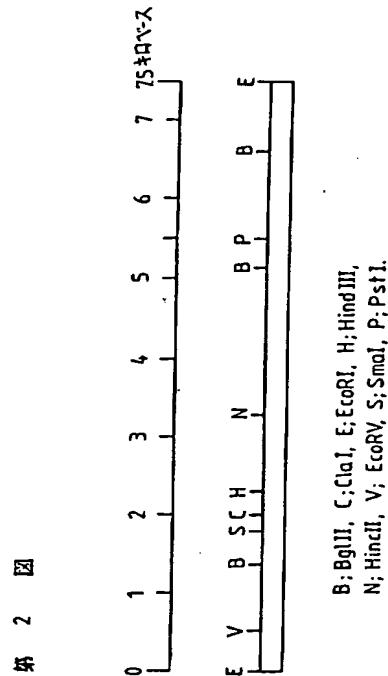


B; BglII, C; ClaI, E; EcoRI, H; HindIII,  
N; NheI, V; EcoRV, S; SmaI.

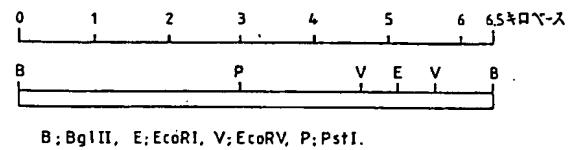
代理人 幸理士 戸田 親男

(8)

特開平3-219878(8)

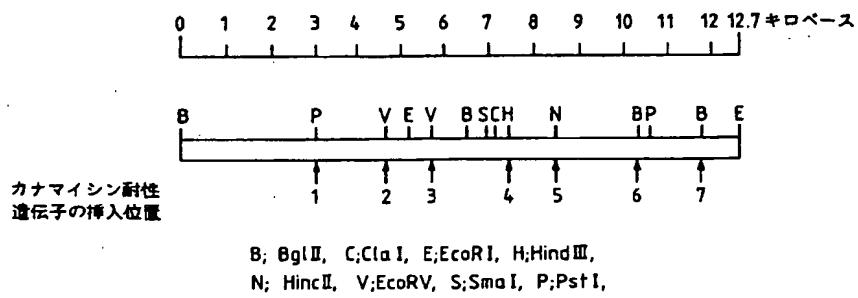


第3図



図面の净書(内容に変更なし)

第4図



- 2

第5圖 - 1

— 435 —

第7圖 - 1

圖6  
第

10	20	30	40	50	60	
ATGCCACCTATAAGCCGTGAMCGAATTTCATACTTGCGGAGCTG Met Arg Ser Val Ile Leu Asn Ile Gln Cys Thr Glu Ile Val						
	70	80	90	100	110	120
	GCTGCCCTGGCGGCAATGCGCACTTATTCGCTATTCGCTGAGCGACA Ala Gln Phe Val Gln Gln Ile Asn Ile Asp Asp Alanine Ile Alanine Glu Val					
	130	140	150	160	170	180
	GCCATGAGAGAGCGCTGATGCCGAACTCTCTGCGCATTCGCCAGATC Ala Alanine Gln Asp Val Ile Asp Thr Ile Ser Ile Gln Alanine Ser Ile Thr					
	190	200	210	220	230	240
	CTGAACTGCCGAAAGCTGCTATGCGCTTATGATGATGCGATGCTGCGA Leu Alanine Leu Gln Ile Val Ile Ile Gln Val Alanine Ile Val Gln Alanine Pro Leu Gln					
	250	260	270	280	290	300
	GCGATGATGATGCGCTGCGCTGATGATGCGCTGCGCTGCGCTGCGA Gly Ile Ile Asp Ile Thr Asp Gln Alanine Ser Gln Val Pro Ile Asp Ile Ile Pro					
	310	320	330	340	350	360
	ATTTGGCGCTATGCCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGA Ala Alanine Ile Thr Alanine Ile Asp Alanine Ile Asp Alanine Ile Alanine Pro Asp Gln					
	370	380	390	400	410	420
	GCTGCCATGTCGGCGATGTCGGCGATGTCGGCGATGTCGGCGATGTC Thr Alanine Ile Ile Asp Gln Alanine Ile Asp Alanine Ile Asp Alanine Ile Alanine Pro Asp Gln					
	430	440	450	460	470	480
	ACGACGAGCTATTCGCGCTATTCGCGCTATTCGCGCTATTCGCGCTATTC Threonine Alanine Ile Ile Asp Gln Alanine Ile Asp Alanine Ile Asp Alanine Ile Alanine Pro Asp Gln					

特開平3-219878(10)

(11)

特開平3-219878(11)

第7回 - 2

### 第7図-3

1030	1040	1050	1060	1070	1080
CTGGCCGATCTGGTGGCGTTCAACGGTGCAACCTGGCGTGAAATTATTTCGAATGCT					
LeuAlaAspLeuArgGlyLeuSerProValCinArgAlaArgGluIleIleSerLysCys					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GCGCATCCGGATTACCGGCCGATGTGCGAGGATTATTTGATCGTGCCTTAAMATTCC					
AlaIleIleProAspThrArgProMetLeuGlnAspThrPheAspArgAlaLeuLysAsnSer					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TITGGTAACACACACCCGATCTGGTGCACCGAACGCTCTGCTTGGCATCAGCGGTTATT					
PheGlyLysIleThrProIleLeuThrGluAlaLeuSerTrpIleGlnArgPheIle					
1210	1220				
GATAACGGCACCATGCTCCCCATCA					
AspThrGlyThrMetLeuProSer					

特開平3-219878(12)

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 N 15/31		
(C 12 R 1:02)		
(C 12 N 1/21		
(C 12 R 1:02)		
(C 12 N 15/52		
C 12 R 1:02)		

手続補正書(方式)  
平成2年5月9日  
10/11

特許庁長官署

## 7. 補正の対象

図面

## 8. 補正の内容

(1) 第4図を別紙のとおり補正する。(内容を変更なし)

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第24395号

## 2. 発明の名称

酢酸耐性遺伝子、それを含むプラスミド及び  
形質転換した酢酸菌

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
 住所 愛知県半田市中村町2丁目6番地  
 名称 株式会社 中塩酢店  
 代表者 中塩又左二郎

## 4. 代理人

住所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号  
 邦楽ビル503  
 10.11 氏名 弁理士(7577) 戸田親男 (監査士)  
 555-0333

## 5. 補正命令の日付

平成2年5月22日(発送日)

## 6. 補正により増加する発明の数 なし

4件